

9/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002529320

WPI Acc No: 1980-47348C/198027

**Ubiquinone prepn. - by first adding organic cationic coagulant,  
inorganic**

**coagulant or persimmon shibu to culture of Pseudomonas bacteria**

Patent Assignee: GODO SHUSEI KK (GODO )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 55068295	A	19800522				198027 B
JP 86017472	B	19860507				198622

Priority Applications (No Type Date): JP 78141090 A 19781117

Abstract (Basic): JP 55068295 A

Process comprises (a) adding organic cationic coagulant,  
inorganic

coagulant or persimmon 'shibu' to a culture of a suitable  
Pseudomonas

bacteria under neutral or alkaline conditions with heating to 80-  
100

degrees C; (b) aggregating the bacterial body; (c) sepg. it by  
screening (d) dehydrating; (e) extracting ubiquinone with organic  
solvent; and (f) refining crude extracted ubiquinone.

The bacterial body can be easily aggregated using a relatively  
small amt. of coagulant by adding the coagulant at pH 3.0-9.0 (7.0-  
8.5)

at 60-100 (85-95) degrees C.

Title Terms: UBIQUINONE; PREPARATION; FIRST; ADD; ORGANIC; CATION;  
COAGULATE; INORGANIC; COAGULATE; PERSIMMON; CULTURE; PSEUDOMONAS;  
BACTERIA

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12N-001/02; C12P-007/66;  
C12R-001/38

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* V800 G100 M531 L951 H541 H542 H721 H711 H722 H723 M240 M232 M233  
M331 M333 N130 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* K0 H5 H7 M282 M210 M211 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225  
M226

M231 M232 M240 M270 M311 M315 M316 M320 G100 M531 L951 H541 H542  
H721 H711 H722 H723 N130 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902

?

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—68295

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 P 7/66

# C 12 R 1/38

識別記号

庁内整理番号

6760—4 B

④ 公開 昭和55年(1980)5月22日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 5 頁)

## ⑤ ユビキノンの製造方法

② 特 願 昭53—141090

② 出 願 昭53(1978)11月17日

⑦ 発 明 者 相田浩

浦和市根岸681番地

⑩ 出 願 人 合同酒精株式会社

東京都中央区銀座6丁目2番10号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ユビキノンの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

ユビキノン生産能を有するシウドモナス属菌株の培養液を中性乃至アルカリ性において、80℃以上沸とうに到る範囲の温度に加熱する前、または加熱中乃至加熱後の熱時に、有機カチオン系凝集剤、無機凝集剤または柿渋を添加することにより菌体を凝集させ、これを適当な網目上に移して、菌体を分離、脱水後有機溶剤でユビキノンを抽出、精製することを特徴とするシウドモナス属菌株の培養液からのユビキノンの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はユビキノン生産能を有するシウドモナス属菌株の培養液を中性乃至アルカリ性 pH 域において、80℃以上沸とうに到る範囲の温度に加熱する前、または加熱中乃至加熱後の熱時に、有機カチオン系凝集剤、無機凝集剤または柿渋を添加して菌体を凝集させて、これを適当な網目の上に

移して菌体を分離、乾燥後有機溶剤でユビキノンを抽出精製することを特徴とするシウドモナス属菌株培養液からのユビキノンの製造方法に関するものである。

ユビキノン生産能を有するシウドモナス属菌株を培養するとユビキノンは菌体内に産生されるが、この菌体内ユビキノンの量は、他の醗酵生産物の場合の蓄積量に比べて少量であるため、これを工業的に収率よく得るためには培養液から菌体を効率よく、廉価で簡易な操作でしかも迅速に取得することが第一の要諦である。

また得られた菌体からユビキノンを抽出するに要する溶剤の種類および量を可及的に少なくすることが好ましい。

従来、微生物特にシウドモナス属菌体を回収する方法としては、種々検討されているが、低廉かつ効率の良い方法は見出されておらず、例えば現在利用されている高性能な遠心分離機、減圧または加圧式濾過機による方法では、設備費、運転費が高額となり、また培養液の pH を 4.0 以下で低速

遠心分離する方法では非常に回収率が低い。

培養液に種々の凝集剤を添加する方法では、回収率は比較的良好であるが、その添加量が多くコスト高となり、目詰まりが起こるなど濾過性も劣悪なものが多く工業的実用化は望めない。

本発明者等は工業的に実施し得る有利な方法を検討した結果、培養液のpHを調整し、加熱して熱時に、または加熱開始前あるいは途中で有機カチオン系乃至無機の凝集剤または柿渋を添加、混合すると、常温時添加に比べて非常に少量の凝集剤により菌体はほとんど瞬間的に凝集し、低速遠心分離は勿論、濾過助剤なしで容易に濾過集菌できるばかりでなく、無圧濾過も可能となることを見出した。

すなわち、上記の方法による菌体フロックは用いる凝集剤によつてその大きさ、強度に差があるが、これらは適当な網目（材質は、ステンレススチール乃至合成樹脂製が望ましい）上に移して容易に分離でき、適当な厚さに調整後そのまま通風乾燥することが可能である。

- 3 -

調節し、煮沸水浴中に入れて60～100℃、好ましくは85～95℃に3～4分間加熱し、すぐ熱時にカチオン系凝集剤または柿渋を添加混合すると、その添加量は常温での添加量の10分の1乃至それ以下の量により、直ちに凝集が起こり、一旦凝集した菌体は冷却後も元に戻らず、凝集菌体以外の透明液区分には、顕微鏡<sup>的</sup>にも菌体はほとんど見当らない。

この菌体凝集操作に際し、凝集剤を添加後加熱した場合も前述と同様の効果がある。例えば凝集剤を添加後煮沸すると3～5分間でフロックを生じ、それ以上長時間煮沸しても凝集剤添加量はほとんど変わらない。しかし加熱した後冷却してから凝集剤を添加した場合は凝集効果が劣り、最適条件の場合に比し、多量の凝集剤を必要とする。

また、前述のようにキトサン添加の場合は、常温では凝集菌体が浮上するが、塩化カルシウムを少量加えてから加熱添加すると容易に沈降するようになる。

一方、加熱培養液にアニオン系凝集剤を添加し

かくして得られた菌体または乾燥菌体からユビキノンの抽出精製を行ない得られた結晶はユビキノンであることを確認し、またその回収率は従来の集菌、抽出方法によるものと同様以上であることを見出し、本発明を完成した。

ユビキノン生産能を有するシウドモナス属菌株の培養液から菌体を得る方法として従来知られている通り有機カチオン系またはアニオン系凝集剤を用いると、それ等の種類および量によつて凝集の形態および凝集に要する時間に差はあるが、菌体の凝集沈殿現象が認められる。しかし一般に多量（培養液あたり0.5～1.0%）を必要とし、沈殿速度が遅く（12～24時間）しかもフロックの大きさは不十分で軟弱であり、コスト的にも現場作業上にも問題が多い。例外としてキトサンはほとんど瞬間的に凝集が起こり、フロックも大きいが比重が軽く、浮上する特徴がある。しかし添加量が多い点では例外でない。

しかしながら、各種の検討を重ねた結果、培養液のpHを3.0～9.0に、好ましくは7.0～8.5に

- 4 -

た場合は、細かい菌体懸濁物が多量生ずるが長時間経過しても沈降せず、カチオン系凝集剤とは異なる傾向を示す。

適正な条件下でフロックを生じた培養液は、2000×<sup>9</sup>/<sub>5</sub>、10分間で容易に遠心分離され、また濾過助剤なしで低圧濾過される。

また、得られる凝集菌体の大きさは、凝集剤のちがいにより多少異なるが、直径が大体0.2～1.0%以上であること、およびフロックが壊れ難い点を利用して、直径0.2～1.0%の網目上に移し、容易に固液分離が可能であり、そのまま或いはローラーで水切り後、メタノールで加熱抽出するか或いはその網ごと通風乾燥後抽出操作を行なうことができる。

通風乾燥後の抽出について通常収量の低いことが指摘されているが、直接非極性溶剤（例えば、n-ヘキサン）では抽出せず、少量の極性溶剤（例えば、メタノール）に懸濁してから非極性溶剤で抽出すると回収率は良好となり、使用メタノールは10分の1以下で足りる。また湿菌体からその

- 5 -

- 6 -

まゝメタノールで加熱抽出し、場合、一旦遠心分離または濾過などにより、メタノール層と抽出残渣を分別してから $\alpha$ -ヘキサン抽出しないと一般にメタノール層と $\alpha$ -ヘキサン層の分離が非常に困難であるが、本発明による乾燥菌体からの抽出においては、メタノール層と抽出残渣を分別することなく、 $\alpha$ -ヘキサンを添加しても、ユビキノンは容易に $\alpha$ -ヘキサン層に移り、メタノールと抽出残渣混合液とを簡単に分別できる特徴がある。

かくして得られた抽出液からシリカゲルクロマトグラフィーにより、ユビキノン区分を分別し、再結晶を繰り返した結果、得られた物質は紫外線および赤外線吸収スペクトル、クラヴエン・テスト (Craven test)、マススペクトルなどの分析の結果、ユビキノンであることが確認され、収率も常法による場合と同等である。

本発明に使用する凝集剤としては、各種の市販品の中、アクリルアミド、またはアクリルエステル系のものは、効果に若干の差はあるが使用可能

- 7 -

第1表

加熱前 pH	キトサン 添加量(%)	加熱後 調整 pH	フロック形 成の状態	処理液の 透明度
5	0.1	5	—	—
		6	—	—
		7	—	—
		8	+	—
6	0.1	5	—	—
		6	—	—
		7	+	—
		8	+	+
7	0.1	5	—	—
		6	—	—
		7	++	++
		8	++	++
8	0.1	5	—	—
		6	+	++
		7	++	++
		8	++	++

※ フロック形成の状態

— : フロック形成せず

+ : 僅少

++ : やゝ良好、軟、小 (径0.2%以下)

+++ : 良好、強固、大 (径0.2~1%以上)

※ 処理液の透明度

— : 不透明 ++ : 透明

+ : 混濁

++ : やや混濁

- 9 -

であり、キトサンまたは無機凝集剤 (塩化カルシウム、硫酸アルミニウムなど) あるいは、柿渋も本発明の凝集剤として使用が可能である。

次に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

## 実施例 1

グルコース 2%、ポリペプトン 1%、酵母エキス 1%、食塩 0.2%、pH 7.0 の培地にシウドモナス・シユイルキリエンシス (*Pseudomonas Schuylikilliensis*) IAM-1092 を 48 時間培養し (30 L 容ジャーファーマンタ、15 L 仕込、250 rpm、1vvm、30°C) この培地 100 ml を、それぞれ pH 4、5、6、7、8、9 に調整し、85°C、3 分間加熱後、0.5% キトサン液を加え、pH が所定の値より低下する場合は 10% 水酸化ナトリウム液で所定 pH まで補正して、凝集効果を比較検討した。

その結果、キトサン添加量を 0.1% に固定した場合第 1 表のとおりであつた。

- 8 -

また、pH 4、5、6 で加熱し、キトサン添加後それぞれ pH 4、5、6 に調整した場合には、培地当りキトサン添加量を 0.5~1% にしても、凝集は不完全で、粘りような溶液になるにとどまるが、それぞれの pH で加熱後直ちに pH を 7.5 に調整した場合は、pH が高い程、少ないキトサン量で凝集が起こる。pH 7、8、9 で加熱後キトサンを添加する場合については、7 で加熱し、キトサン添加後 pH 7.5 に調整するのが、最も少量の添加量で完全凝集が起こり、培養液当り 0.1% であつた。pH 8 の場合がこれに次いで効果的であり、いずれの場合も凝集菌体の周囲の液は透明となり、顕微鏡観察で菌体はほとんど存在しなかつた。

## 実施例 2

グルコース 1%、コーン・ステイブ・リカー 8% の培地に、シウドモナス・ディミニータ (*Pseudomonas diminuta*) IAM-1513 を接種し、30 L ジャーファーマンタに 15 L 仕込、150 rpm、1vvm、30°C、48 時間培養で 12 mg/L のユビキノンを蓄積せしめた。この培養液を pH 8.0 で種々の

- 10 -

90℃で3分間保 添加すると0.1%であつた。

第2表

加熱前pH	加熱温度 (℃)	培養液100mlに対する $4 \times 10^{-1} M$ CaCl <sub>2</sub> 添加量 (ml)	フロック 形成状態	透明度
8.0	室温	5.0	— ※	— ※
	40	"	—	—
	60	"	+	—
	80	"	+++	++
	95	"	+++	+++

(※表示は第1表と同じ)

この凝集菌体を32メツシュの篩上に移すとほとんど全部の菌体が篩上に残り、濾過は非常に容易であつて、回収した菌体の水分は77%であつた。

これに対して室温で凝集した菌体は水和度が大きく、32メツシュの篩上に残るが却つて目詰まりを生じ、濾過が困難であつた。

また、加熱後冷却してから添加すると効果は非常に低下し、完全凝集が得られなかつたり、必要添加量が増加した。

培養液5Lから本発明の方法で得た凝集菌体

— 12 —

温度に加熱した後、塩化カルシウムおよびキトサンを添加する場合について検討した結果、塩化カルシウムについては、80℃以上の加熱後の添加でないと、著しい効果はみとめられなかつた。

すなわち塩化カルシウムの添加は、室温、40℃、60℃では、100mlの培養液に対して、 $4 \times 10^{-1} M$ の塩化カルシウムを5ml添加した場合、細かい沈澱がゆつくり生ずるが1夜経過後も透明な上澄液は得られず、濾過助剤として、ダイカライトバーライト4109を2%添加して、ようやく透明液が得られた。しかし80℃および95℃に3分間加熱した後5ml添加し攪拌するとほとんど瞬間的に大きなフロックが形成され透明液が得られ、70メツシュの篩上に移すと98%の菌体が篩上に残留した。

また、3000rpm、10分間の遠心分離で完全に集菌できた。一方キトサンの場合は、完全凝集し透明液が得られる添加量は、室温、40℃、60℃3分間保持で培養液当り、0.9~1.0%であり、加熱時間を長くしても効果がなかつたが、80℃、

— 11 —

110gを50℃で通風乾燥して、ユビキノンQ<sub>10</sub>の抽出を検討し次の結果を得た。

メタノールを添加し30℃、60分間抽出し、メタノール層からn-ヘキサンにユビキノンQ<sub>10</sub>を抽出する操作では、乾燥前の菌体の場合メタノール250ml、n-ヘキサン250mlを用い、58.0mgを得た。一方乾燥菌体の場合はメタノール250ml、n-ヘキサン1250mlで十分抽出され60.5mgが得られた。また、n-ヘキサンで直接抽出した場合は、50.2mgが得られた。乾燥菌体を用いるとメタノール抽出後、メタノール層と菌体残渣を分別することなくn-ヘキサンを加えても、ユビキノンQ<sub>10</sub>は容易にn-ヘキサンで抽出され、両層の分離が良好であつたが、湿菌体では一旦菌体残渣を分別除去しないとn-ヘキサンを加えても、分離困難であつた。

## 実施例3

実施例1と同一組成の培地で同一条件下で、シウドモナス・デニトリフィカンス(Pseudomonas denitrificans) IAM-12023を培養し、実施例1および2と同様の試験を行ない、それらと同等の

— 13 —

結果が得られた。

## 実施例4

実施例1と同一組成の培地で醗酵終了した、シウドモナス・ウッドシ(Pseudomonas Woodsi)の培養液をpH7.5に調整し、そのまま遠心分離して完全に集菌するには、8000×g、10分間を必要とするが、85℃、3分間加熱後、 $4 \times 10^{-1} M$ の塩化カルシウム液を培養液に対して5%添加して2500×g、10分間で100%菌体回収ができた。常温で添加した場合、同様に遠心分離すると78%の菌体が回収された。85℃、3分間加熱しただけで同様の遠心分離をした場合の菌体回収率は、87%であり、pH3.5に調整して同様の条件で遠心分離すると菌体回収率は、74%であつた。

## 実施例5

実施例2の醗酵終了培養液100mlをpH7.5に調整後室温および85~90℃に3分間それぞれ保つた後、柿渋を添加した結果、室温添加の場合は市販柿渋10~20mlでは著しい凝集は認められなかつたが、85~90℃に加熱後すぐ添加した場合

— 14 —

には、4.0mlの添加混合によ<sup>●</sup>ちに著しい凝集が起こり、フロックも大で透明な上澄液が得られた。このようにして得られた凝集菌体から常法によつてユビキノン分画を抽出、精製し、得られた黄色結晶の物理化学的諸性状は、ユビキノンQ<sub>10</sub>と一致した。

#### 実施例 6

実施例 2 の醗酵終了培養液 100ml につき、実施例 4 と同様の条件で市販のカチオン系凝集剤、例えば、サンボリー K505、K744、セディブル OF-900、ダイヤフロック KP001、KP007、KP201B、スミフロック FOP などについて検討した結果、各凝集剤によつて若干の差異はあるが、それ等の 0.2% 溶液を 100ml 加えても著しい凝集は生じなかつたが、加熱後十分温度の高いうちに 4~18ml を添加して攪拌すると、直ちに著しい凝集が生じ、透明な上澄液が得られた。

また、凝集剤を添加した後で加熱しても加熱後添加した場合と同等またはそれ以上の、凝集効果がみとめられた。

- 15 -

加熱前 pH 8.5、<sup>●</sup>温度 85~95°C、ダイヤフロック KP201B の 0.4% 溶液を使用した場合の結果を第 3 表に示す。

第 3 表

培養液 100ml に対する 凝集剤添加量 (ml)	透 明 度			
	加 熱		無 加 熱	
	3分	20分	20分	10時間
1.0	+	+	-	-
2.0	++	++	-	-
4.0	卅	卅	-	-
6.0	卅	卅	-	-

(※ 表示は第 1 表と同じ)

特許出願人 相 田 浩

- 16 -